生物钟 PRR 蛋白促进拟南芥幼苗中花青素的合成

杨甲甲[1,2]，杨米连[1,2]，胡彦如[1*]

（1．热带植物资源可持续利用重点实验室，中国科学院西双版纳热带植物园，昆明 650223； 2．中国科学院大学，北京 100049）

摘要：生物钟（circadian clock）是激发植物生理特征节律性表达并使之维持稳定的保守内源调节机制。PRR（PSEUDO-RESPONSE REGULATOR）蛋白家族是生物钟中央振荡器的重要组分，调控植物种子萌发、下胚轴伸长和开花等多种生命过程。花青素（anthocyanins）是植物次生代谢产物，对植物的繁衍、生长发育和抵抗逆境胁迫有重要作用。该文以拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）为研究对象，探讨生物钟 PRR 蛋白对花青素生物合成的调控功能和分子机制。结果表明：（1）在 *PRR* 基因单突变体及多突变体幼苗中，花青素的积累明显降低，并且某些花青素合成相关基因的表达显著降低。（2）相反，在 *PRR*5 过表达幼苗中，花青素的积累以及某些花青素合成相关基因的表达显著升高。（3）蛋白相互作用实验结果表明，PRR5 蛋白能与 MYB75、TT8、MYB90 及 MYB113 等花青素调控蛋白相互作用形成复合物。（4）遗传学分析结果表明，拟南芥 PRR5 诱导幼苗中花青素的合成依赖于 MYB 家族花青素调控蛋白。综上所述，生物钟 PRR 蛋白可能通过 PRR5 与 MYB75、TT8 等相互作用促进拟南芥幼苗中花青素的合成和积累。

关键词：拟南芥，生物钟，PRR 蛋白，花青素，MBW 复合体

中图分类号：Q943　　　　**文献标识码：**A

Circadian clock PRR proteins stimulate anthocyanin synthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings

YANG Jiajia[1,2], YANG Milian[1,2], HU Yanru[1*]

(1. *CAS Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650223, China; 2. *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: The circadian clock is a conservative endogenous regulatory mechanism that stimulates and maintains the rhythmic expression of plant physiological characteristics. The PRR proteins are critical components of the circadian clock central oscillator and regulate a variety of life processes such as seed germination and flowering. Anthocyanins are plant secondary metabolites, which play an important role in plant growth, reproduction and stress responses. In this study, we took *Arabidopsis thaliana* as the research object and explored the function and mechanism of circadian clock PRR proteins in the control of anthocyanin biosynthesis. The results were as follows: (1) The accumulation of anthocyanins and the expression of some anthocyanin synthesis-related genes were significantly reduced in *PRR* genes single mutant and multiple mutant seedlings. (2) In the seedlings with overexpression of *PRR*5, the accumulation of anthocyanin and the expression of

---

基金项目:国家自然科学基金（31870258，31922009）［Supported by National Natural Science Foundation of China (31870258, 31922009)］。

第一作者:杨甲甲（1996 - ），硕士，研究方向为植物激素调控与环境适应性，（E-mail）yangjiajia@xtbg.ac.cn。

[*]**通信作者:**胡彦如，博士，研究员，研究方向为植物激素调控与环境适应性，（E-mail）huyanru@xtbg.ac.cn。

some anthocyanin synthesis-related genes were significantly increased. (3) The results of the protein-protein interaction experiment showed that PRR5 protein can interact with MYB75, MYB90, MYB113 and TT8 to form protein complexes. (4) Results of genetic analysis showed that PRR5 promoted anthocyanin synthesis in *A. thaliana* seedlings was the MYB family anthocyanin regulatory proteins dependent. In conclusion, the circadian clock PRR protein may promote the synthesis and accumulation of anthocyanins in *A. thaliana* seedlings through the interaction of PRR5 protein with MYB75, TT8.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, circadian clock, PRR protein, anthocyanin, MBW complex

花青素，又称花色素苷，是植物次级代谢产物，在花、果实和叶片等植物器官中广泛存在（Liang et al., 2018; Song et al., 2021）。植物体内六类花青素天竺葵素（Pelargonidin）、矢车菊素（cyanidin）、芍药素（peonidin）、矮牵牛素（petunidin）、飞燕草素（delphinidin）和锦葵素（malvidin）通过糖基化、甲基化和酰基化等修饰作用生成 600 余种花青素，从而赋予植物丰富的色彩（Li et al., 2018; Wang et al., 2018; Gardeli et al., 2019; Sun et al., 2021）。花青素可以提高植物对多种逆境胁迫的抵抗能力，对植物适应环境具有重要意义（Hatier et al., 2013; Fan et al., 2016; Li et al., 2018）。此外，花青素具有丰富的观赏价值、营养价值和医疗价值（Davies et al., 2012; Peiffer et al., 2016; Nomi et al., 2019）。编码花青素生物合成通路中相关酶的结构基因主要分为两类：*CHS*、*CHI* 和 *F3H* 等早期花青素生物合成基因以及 *DFR*、*ANS* 和 *UFGT* 等晚期花青素生物合成基因（Deng & Lu, 2017; Chen et al., 2020）。这些结构基因受到多种转录因子的精密调控，其中被研究最多也是最重要的分别是 MYB（Myeloblastosis）、bHLH（basic Helix-Loop-Helix）和 WDR（又称 WD40）三类转录因子家族（Tanaka et al., 2008）。MYB75/PAP1 是拟南芥 MYB 蛋白家族中调控花青素合成的重要转录因子，过表达 *MYB*75 转基因植物的根、茎、叶和花中积累了大量花青素（Rinaldo et al., 2015; Shin et al., 2015）。此外，MYB 家族 MYB90/PAP2、MYB113 和 MYB114 也正调控拟南芥花青素的生物合成（Gonzalez et al., 2008; Maier et al., 2013; Shi & Xie, 2014）。bHLH 蛋白家族 TT8、GL3、EGL3 和 MYC1 等通过激活 *CHS*、*DFR* 等结构基因的表达，参与调控花青素的合成（Martinez-Garcia et al., 2000）。WDR 蛋白家族 TTG1 等也是诱导花青素稳定积累不可或缺的一类重要转录因子（Payne et al., 2000）。MYB、bHLH 和 WDR 三类转录因子除了可以各自发挥功能促进植物花青素的合成外，三者可以结合形成三元 MBW 复合体直接调控结构基因的表达促进植物花青素的合成（Liang et al., 2018）。越来越多的研究结果表明 microRNA 也直接或间接的参与调控了植物体内花青素的合成（Varsha et al., 2019; He et al., 2019; Maria et al., 2019）。基于花青素的生物学功能及在育种、食品和医药等方面的应用前景，深入研究花青素生物合成与调控信号具有重要的应用价值和科学意义。

近年来，外源环境信号及内源植物激素信号调控花青素生物合成与积累的研究取得了重要进展。例如，光强和光质均对花青素的合成起关键作用（Guo et al., 2008; Maier & Hoecker, 2015）；低温促进花青素的生物合成（Mori et al., 2007; Zhang et al., 2011）；植物激素脱落酸、茉莉酸、生长素等通过调控花青素合成相关基因的表达来影响植物花青素的合成与积累（Ji et al., 2015; Xie et al., 2016; Chen et al., 2019; Chen et al., 2020）。植物生物钟系统通过核心振荡器接收外界环境中如光照、温度和营养元素等环境因子动态变化的时间信息（输入途径），在植物体内产生内源性的昼夜节律（中央振荡器），进而调控植物生长发育的众多过程，如开花、生物和非生物胁迫响应、激素代谢等多种生命过程（输出途径）（Wei et al., 2018）。PRR 家族中的 PRR5、PRR7 和 PRR9 是中央振荡器早循环的关键组分，在调控植物生长发育和响应逆境胁迫方面发挥了重要作用（Sanchez & Kay, 2016）。生物钟与花青素均在植物响应逆境胁迫中发挥重要功能（Wei et al., 2018; Song et al., 2021），但是关于生物钟信号调

控花青素合成的研究尚未见报道。近期有研究表明，生物钟 PRR 蛋白能够促进 ABA 信号抑制种子萌发及萌发后生长（Yang et al., 2021），而 ABA 信号可以诱导拟南芥幼苗中花青素的合成与积累（Chen et al., 2020）。那么生物钟 PRR 蛋白是否与花青素合成直接相关呢？本研究以拟南芥为实验材料，通过分子生物学和遗传学相关的实验方法探究了生物钟 PRR 蛋白促进拟南芥幼苗花青素合成的生物学功能及其分子机制。这对于发掘 PRR 蛋白新的生物学功能，深入理解生物钟信号调控植物幼苗的环境适应性具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 植物材料及生长条件

本研究中所使用的野生型（WT）、突变体和过表达拟南芥植物均属于哥伦比亚（Col-0）遗传背景，突变体种子 *prr*5-1（SALK_006280）、*prr*5-2（SALK_135000C）、*prr*7-1（SALK_091569C）和 *prr*7-2（SALK_030430C）来源于俄亥俄州立大学的拟南芥资源中心，*prr*5 *prr*7 双突变体是通过 *prr*5-1 和 *prr*7-2 采用遗传杂交得到，*prr*5 *prr*9 和 *prr*5 *prr*7 *prr*9 由中国科学院植物研究所王雷研究员提供，*myb-RNAi* 由杨洪全教授提供。为了获得 35*S:PRR*5-*FLAG* 转基因植株，将 2FLAG 标签序列连接的 *PRR*5 全长 cDNAs，使用 *Sma*I 和 *Xba*I 酶切位点克隆到由 *CaMV* 35*S* 启动的 pOCA30 载体，经农杆菌转化野生型（Col-0）拟南芥获得 T_3 代纯合 *PRR*5 过表达植物（Yang et al., 2021）。根据需要选取适量拟南芥突变体种子、过表达种子和野生型种子，加入 20%种子消毒液（立白白衣漂渍液）浸泡 8 min，使用无菌水清洗 3～5 次，播种于含有 1%（w/v）蔗糖的 1/2 MS 固体培养基上（pH 5.8）。4℃春化 24 h 后，转移到光照培养间长日照条件下（全天 22℃，白光光照 16 h，黑暗 8 h）条件下培养 8 d 左右，移栽至湿润土壤中。使用保鲜膜覆盖幼苗，放置在培养间长日照条件下，2～3 d 后揭膜继续培养。

1.2 花青素含量的测定

在长日照条件下生长 6 d 的拟南芥幼苗（包括 Col-0、*prr*5-1、*prr*5-2、*prr*7-1、*prr*7-2、*prr*5 *prr*7、*prr*5 *prr*9、*prr*5 *prr*7 *prr*9 和 35*S:PRR*5-*FLAG* 等），于当天光照的第 10 个小时（ZT 10）进行取样并称重 W(g)，加入 1 mL 花青素提取液（甲醇、盐酸体积比为 99∶1）。4℃黑暗条件下振荡 24 h，13 000 r min^{-1} 离心 10 min 后吸取上清。以花青素提取液作空白对照，使用分光光度计测量上清液在 530 nm、657 nm 波长处的吸光度（A_{530} 和 A_{657}）。花青素相对含量用公式（A_{530}-0.25×A_{657}）g^{-1} FW 计算（Chen et al., 2020）。实验至少进行 3 次生物学重复。

1.3 拟南芥 RNA 提取和 RT-qPCR

在长日照条件下生长 6 d 的拟南芥幼苗，于当天光照的第 10 个小时（ZT 10）进行取样，使用 Trizol 试剂提取拟南芥幼苗总 RNA，逆转录成 cDNA 后进行 RT-qPCR 反应（Han et al., 2020）。用于 RT-qPCR 实验的的引物见表 1，基因表达的内参使用拟南芥 *ACTIN*2 基因。实验至少进行 3 次生物学重复。

表 1 RT-qPCR 引物

Table 1 Primers of RT-qPCR

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
*ACTIN*2	TGTGCCAATCTACGAGGGTTT	TTTCCCGCTCTGCTGTTGT
DFR	TGGTGGTCGGTCCATTCAT	GAGAGAGCGCGGTGATAAGG
LDOX	TCCGGGTTTGCAGCTTTTC	ATCAGGAACACATTTTGCAGTGA
UF3GT	TGGAGGTGGCGGTTGAA	CTTTGCCGCGAGAACCA

1.4 酵母双杂交实验（Y2H）

使用酵母双杂交系统（Hu et al., 2019）筛选可能与生物钟 PRR 蛋白相互作用的花青素合成调控蛋白。将 PRR5、PRR7 与 PRR9 的全长编码序列克隆到 pGBKT7 载体，构建质粒 BD-PRR5、BD-PRR7 和 BD-PRR9，并构建分段质粒 BD-PRR5$^{1-180}$、BD-PRR5$^{172-558}$ 和 BD-PRR5$^{502-558}$（Yang et al., 2021）。将花青素合成调控蛋白 MYB75、MYB90、MYB113、MYB114 和 TT8 的全长编码序列克隆到 pGADT7 载体，构建质粒 AD-MYB75、AD-MYB90、AD-MYB113、AD-MYB114 和 AD-TT8，并构建分段质粒 AD-MYB75-N（第 1 至第 122 个氨基酸）、AD-MYB75-C（第 123 至第 249 个氨基酸）、AD-TT8-N（第 1 至第 358 个氨基酸）和 AD-TT8-C（第 359 至第 519 个氨基酸）（Xie et al., 2016; Chen et al., 2020）。构建酵母双杂交实验所需克隆的引物见表 2。

表 2 各种表达载体构建引物

Table 2 Primers used for generating various clones

克隆名称 Clone name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
BD-PRR5	ATACATATGATGACTAGTAGCGAGGAAGTAGTTGAA	ATAGAATTCCTATGGAGCTTGTGTGGATTGGA
BD-PRR5$^{1-180}$	ATACATATGATGACTAGTAGCGAGGAAGTAGTTGAA	ATAGAATTCAAAGCTATCAGGAGCAAGTGAAGTT
BD-PRR5$^{172-558}$	ATACATATGCAAACTTCACTTGCTCCTGATAGC	ATAGAATTCTGGAGCTTGTGTGGATTGGAC
BD-PRR5$^{502-558}$	ATACATATGAAAATTCAGCAATCTCTTCAACGA	ATAGAATTCTGGAGCTTGTGTGGATTGGAC
PRR5-cYFP	ATATCTAGAATGACTAGTAGC	ATAGGATCCTGGAGCTTGTGTGGATTGG
PRR5$^{1-180}$-cYFP	ATATCTAGAATGACTAGTAGC	ATAGGATCCAAAGCTATCAGGAGCAAG
BD-PRR7	ATACATATGATGAATGCTAATGAGGAGGG	ATAGAATTCTTAGCTATCCTCAATGTTTTTTATGTC
BD-PRR9	ATACATATGATGGGGGAGATTGTGGTTTTAA	ATAGAATTCTCATGATTTTGTAGACGCGTCTG
AD-MYB75	ATACATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ATAGAATTCCTAATCAAATTTCACAGTCTCTCCATC
AD-MYB75-N	ATACATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ATAGAATTCCTTTTTCATCTTTATCTTACAACACGG
AD-MYB75-C	ATACATATGAGAGACATTACGCCCATTCCTAC	ATAGAATTCCTAATCAAATTTCACAGTCTCTCCATC
MYB75-nYFP	ATAGGATCCATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ATATCTAGAATCAAATTTCACAGTCTCTCCATCG
AD-MYB90	ATACATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ATAGAATTCCTAATCAAGTTCAACAGTCTCTCCATC
MYB90-nYFP	ATAGGATCCATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ATATCTAGAATCAAGTTCAACAGTCTCTCCATCA
AD-MYB113	ATACATATGATGGGCGAATCACCCAAAG	ATAGAATTCCTAATTCAGTTCTAAAGTCTCTTCATCAAA
MYB113-nYFP	ATAGGATCCATGGGCGAATCACCCAAAG	ATATCTAGAATTCAGTTCTAAAGTCTCTTCATCAAAC
AD-MYB114	ATACATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ATAGAATTCCTAAAAAATATCGACTTTTTGGGC
AD-TT8	ATAGAATTCATGGATGAATCAAGTATTATTCCGG	ATAGGATCCCTATAGATTAGTATCATGTATTATGACTTGGTG
AD-TT8-N	ATAGAATTCATGGATGAATCAAGTATTATTCCGG	ATAGGATCCCGGTAGCCTCTTATCTTTAGTGTTGT
AD-TT8-C	ATAGAATTCCGGGAAGATCTGAGCCACG	ATAGGATCCCTATAGATTAGTATCATGTATTATGACTTGGTG
TT8-nYFP	ATAGGATCCATGGATGAATCAAGTATTATTCCGG	ATAGGATCCTAGATTAGTATCATGTATTATGACTTGGTGG
GUS-nYFP	ATAGGATCCATGGTCCGTCCTGTAGAAACC	ATATCTAGATTGTTTGCCTCCCTGCTGC
GUS-cYFP	ATATCTAGAATGGTCCGTCCTGTAGAAACC	ATAGGATCCTTGTTTGCCTCCCTGCTGC

1.5 双分子荧光互补实验（BiFC Assays）

将 PRR5、PRR5$^{1-180}$、GUS 的编码序列融合于 pFGC-cYFP（Kim et al., 2008）中，构建质粒 PRR5$^{1-180}$-cYFP、PRR5-cYFP 和 GUS-cYFP。将 MYB75、MYB90、MYB113、TT8 和 GUS 的编码序列融合于 pFGC-nYFP（Kim et al., 2008）中，构建质粒 MYB75-nYFP、MYB90-nYFP、MYB113-nYFP、TT8-nYFP 和 GUS-nYFP。将构建好的质粒转化到农杆菌（菌株为 GV3101）中，取不同菌液（OD 值为 1.0）按 1∶1 体积比混合均匀，注射到生长状态良好的本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）叶片中，在避光、湿润的环境中放置 48 h 后，使

用激光共聚焦显微镜（Olympus, Tokyo, Japan）观察 YFP 和 DAPI 荧光（Yang et al., 2021）。构建 BiFC 实验所需克隆的引物见表 2。

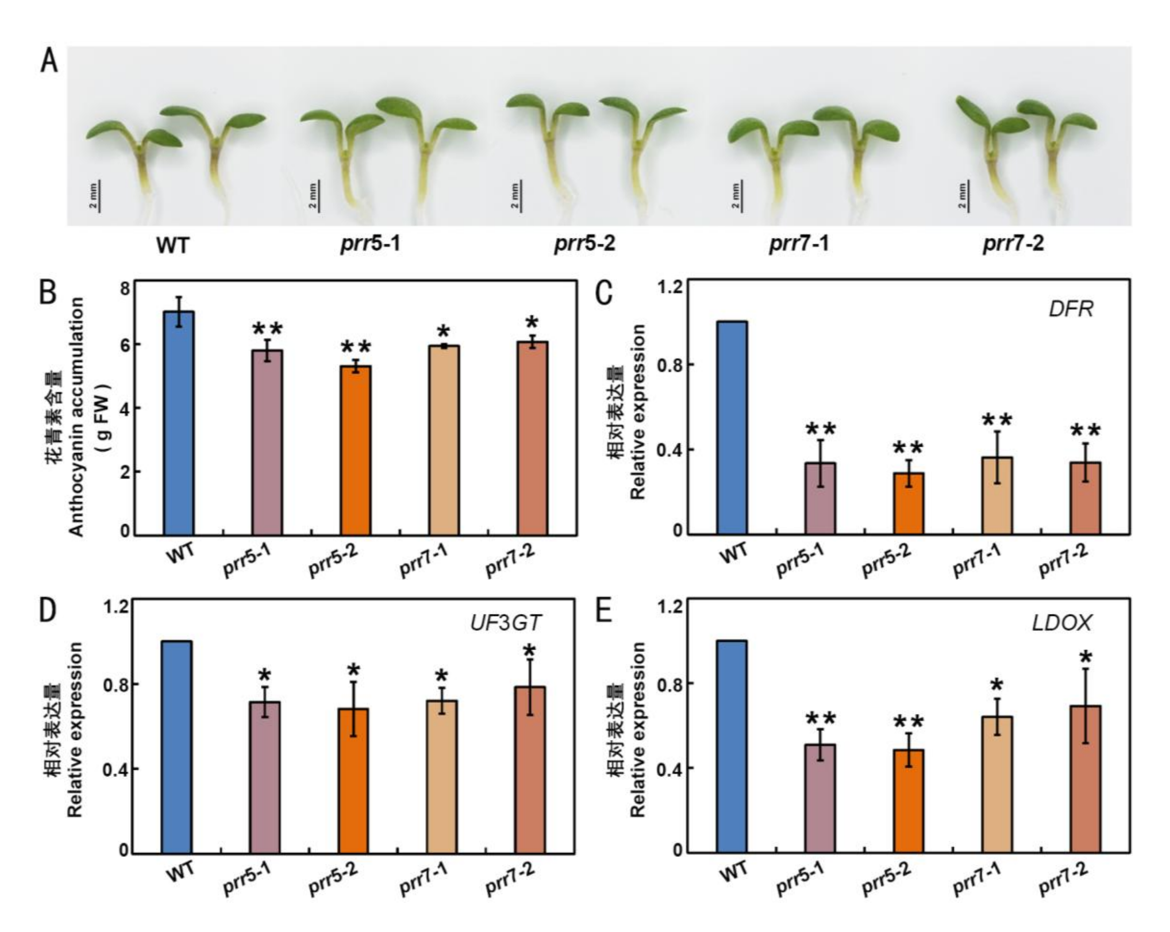
1.6 基因 ID

本课题所涉及到的拟南芥基因的 ID 如下：*PRR*5，AT5G24470；*PRR*7，AT5G02810；*PRR*9，AT2G46790；*MYB*75，AT1G56650；*MYB*90，AT1G66390；*MYB*113，AT1G66370；*MYB*114，AT1G66380；*TT*8，AT4G09820；*DFR*，AT5G42800；*LDOX*，AT4G22880；*UF*3*GT*，AT5G54060。以上所用基因序列信息均可在 The *Arabidopsis* Information Resource（TAIR）网站中获取。

2 结果与分析

2.1 *prr*5 与 *prr*7 突变体幼苗中花青素含量降低

为探究生物钟蛋白 PRR 是否能参与调控植物花青素的合成，观察在 1/2 MS 培养基上生长 6 d 的野生型（WT）、*prr*5-1、*prr*5-2、*prr*7-1 和 *prr*7-2 突变体拟南芥幼苗。结果显示，与野生型相比，*prr*5-1、*prr*5-2、*prr*7-1 和 *prr*7-2 突变体幼苗中花青素积累明显降低，表现为突变体幼苗茎尖颜色更浅（图 1：A）。通过花青素含量测定发现，与观察到的表型相一致，野生型幼苗的花青素含量最高，*prr*5-1、*prr*5-2、*prr*7-1 和 *prr*7-2 突变体幼苗的花青素含量显著低于野生型幼苗，且 *prr*5-1 和 *prr*5-2 突变体幼苗的花青素含量较 *prr*7-1 和 *prr*7-2 突变体幼苗更低（图 1：B）。这些结果表明，当 *PRR*5 和 *PRR*7 突变后，幼苗中花青素含量降低，即 PRR5 和 PRR7 可能诱导植物幼苗花青素的积累。为进一步验证该结果，检测了相关结构基因 *DFR*、*UF*3*GT* 和 *LDOX* 的表达情况。*DFR*、*UF*3*GT* 和 *LDOX* 是编码花青素合成通路中关键酶的结构基因，这些基因的表达直接激活花青素的生物合成，从而促进拟南芥花青素的积累（Tanaka et al., 2008）。提取 WT、*prr*5-1、*prr*5-2、*prr*7-1 和 *prr*7-2 突变体幼苗总 RNA 后逆转录 cDNA，并进行 RT-qPCR 实验，检测 *DFR* 等结构基因的相对表达量。实验结果表明，*prr*5-1、*prr*5-2、*prr*7-1 和 *prr*7-2 突变体幼苗中 *DFR*、*UF*3*GT* 和 *LDOX* 基因的表达量显著降低（图 1：C-E）。这表明 PRR5 和 PRR7 能够通过诱导拟南芥幼苗中 *DFR* 等结构基因的表达促进花青素的积累。



*和**分别表示与 WT 比较有显著差异（*P*<0.05）和极显著差异（*P*<0.01）。下同。

* and ** indicate existing significant differences (*P*<0.05) and extremely significant differences (*P*<0.01) compare to WT. The same below.

图 1 *prr*5 与 *prr*7 突变体幼苗中花青素含量降低

Fig. 1 Decreased anthocyanin contents in *prr*5 and *prr*7 mutant seedlings

2.2 PRR5、PRR7 和 PRR9 协同促进幼苗花青素的积累

为确定 PRR5、PRR7 和 PRR9 蛋白是否协同调控花青素生物合成，观察了 *prr*5 *prr*7、*prr*5 *prr*9 和 *prr*5 *prr*7 *prr*9 等多突变体幼苗的花青素积累表型，结果显示，与野生型相比，*prr* 双突变和三突变体幼苗的花青素积累明显更低，其中 *prr*5 *prr*7 *prr*9 三突变体幼苗花青素积累最低，*prr*5 *prr*7 双突变体幼苗花青素积累低于 *prr*5 *prr*9 双突变体（图 2：A），通过花青素含量测定，结果与观察到的表型相一致（图 2：B）。同样地，发现与 *prr*5-1、*prr*5-2、*prr*7-1 和 *prr*7-2 等单突变体相比（图 1：A，B），*prr*5 *prr*7 和 *prr*5 *prr*7 *prr*9 幼苗花青素含量显著降低，其中 *prr*5 *prr*9 双突变体幼苗花青素含量略低于 *prr*5-1 和 *prr*5-2 单突变体（图 2：A，B）。相一致地，检测相关结构基因 *DFR*、*UF3GT* 和 *LDOX* 的表达，结果显示，与野生型相比，*prr* 双突变和三突变体幼苗中相关基因的表达量明显更低，其中在 *prr*5 *prr*7 *prr*9 三突变体幼苗中表达量最低，在 *prr*5 *prr*7 双突变体幼苗中的表达量低于 *prr*5 *prr*9 双突变体（图 2：C-E）。上述结果表明 PRR5、PRR7 和 PRR9 协同促进幼苗花青素的积累，*prr*5 *prr*7 *prr*9 三突变体幼苗花青素积累更低。

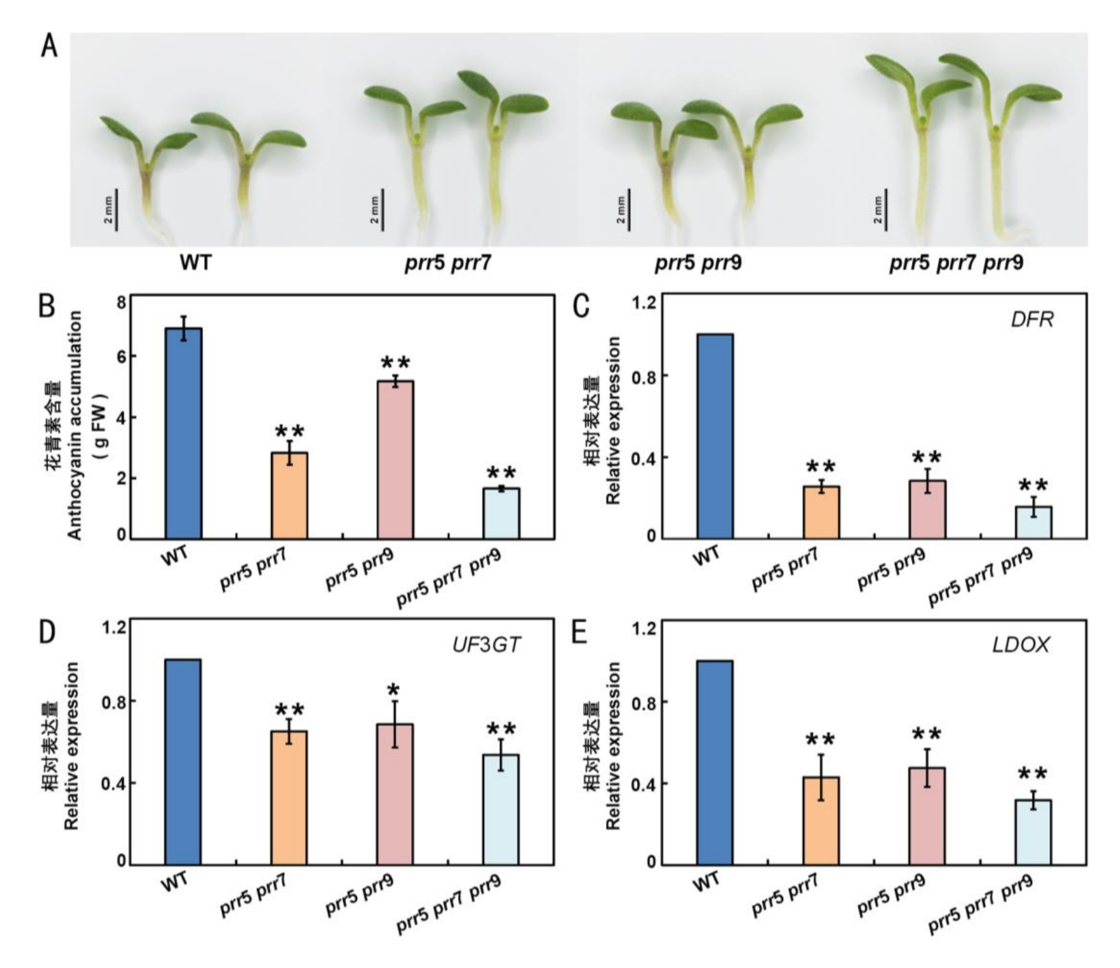


图 2 PRR5、PRR7 和 PRR9 协同促进幼苗花青素的积累

Fig. 2 PRR5, PRR7 and PRR9 synergistically promote anthocyanin accumulation in seedlings

2.3 过表达 *PRR*5 使幼苗中花青素含量升高

为进一步确定 PRR 蛋白调控植物花青素合成的生物学功能，构建了 *CaMV*35*S* 启动子驱动的过表达 *PRR*5 转基因植物 35*S:PRR*5*-FLAG*（Yang et al. 2021），筛选出表达量较高的三个纯合株系（35*S:PRR*5*-FLAG*-9、35*S:PRR*5*-FLAG*-10 和 35*S:PRR*5*-FLAG*-15）并检测其幼苗花青素含量。如图 3：A，B 所示，与野生型相比，35*S:PRR*5*-FLAG*-9、35*S:PRR*5*-FLAG*-10 和 35*S:PRR*5*-FLAG*-15 幼苗中花青素的积累显著升高，表现为茎尖的颜色加深，呈现出明显的紫红色。与之相一致地，*PRR*5 过表达转基因植物幼苗中 *DFR*、*UF3GT* 和 *LDOX* 基因的相对表达量显著高于野生型（图 3：C-E）。这进一步证实了生物钟蛋白 PRR 确实能够促进植物幼苗花青素的积累。

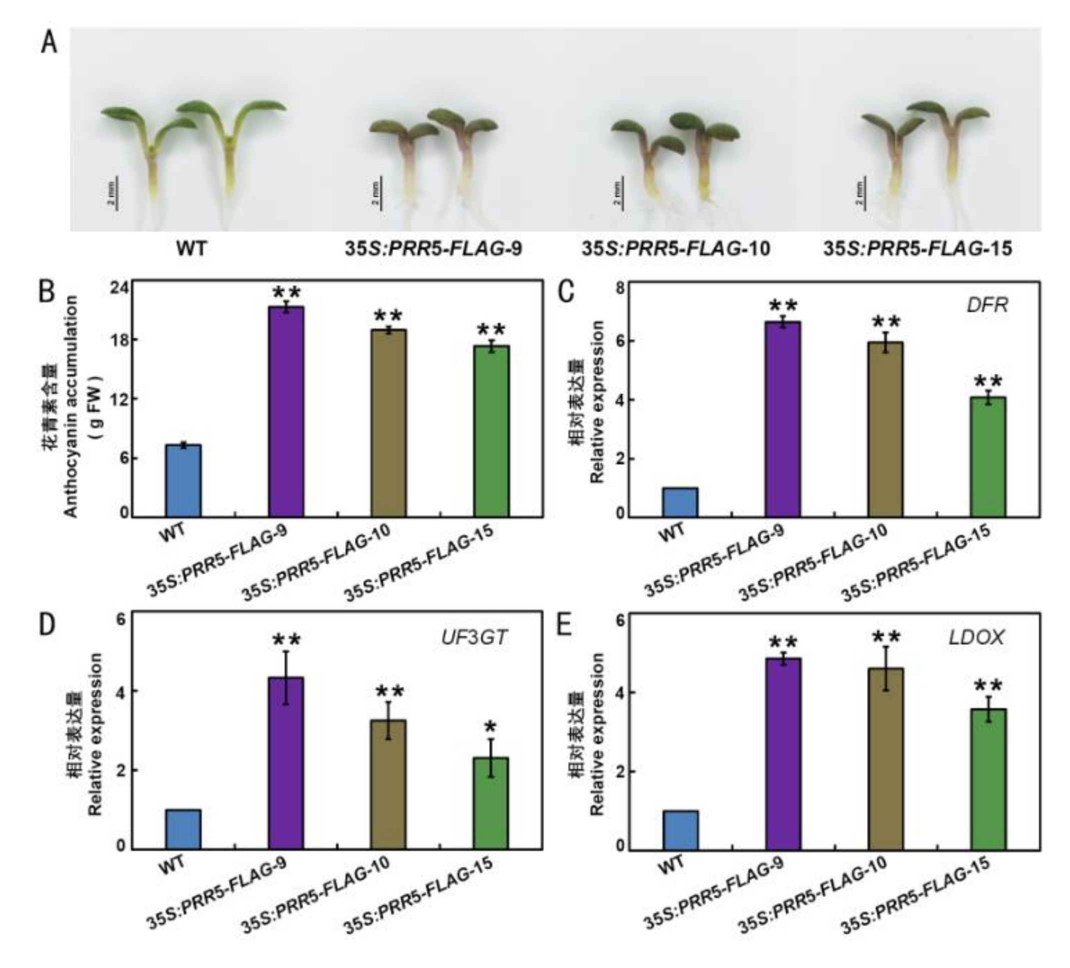


图 3 *PRR*5 过表达使幼苗中花青素含量升高

Fig. 3 Overexpression of *PRR*5 increases anthocyanin content in seedlings

2.4 MYB75 和 TT8 蛋白与 PRR5 蛋白相互作用

为探究生物钟 PRR 蛋白调控拟南芥幼苗花青素合成的分子机理，我们使用酵母双杂交系统（Y2H）筛选可能与 PRR 蛋白相互作用的花青素合成相关蛋白。我们将 PRR5、PRR7 和 PRR9 与诱饵载体 Gal4 DNA 结合域载体相融合（BD-PRR5 等），MYB75、MYB90、MYB113、MYB114 和 TT8 等花青素合成相关蛋白与猎物载体的 Gal4 DNA 激活域融合（AD-MYB75 等）。通过酵母双杂交实验表明，MYB75 和 TT8 蛋白与 PRR5 蛋白在酵母中发生强相互作用，而 MYB90、MYB113 蛋白与 PRR5 蛋白在酵母中相互作用较弱（图 4）。

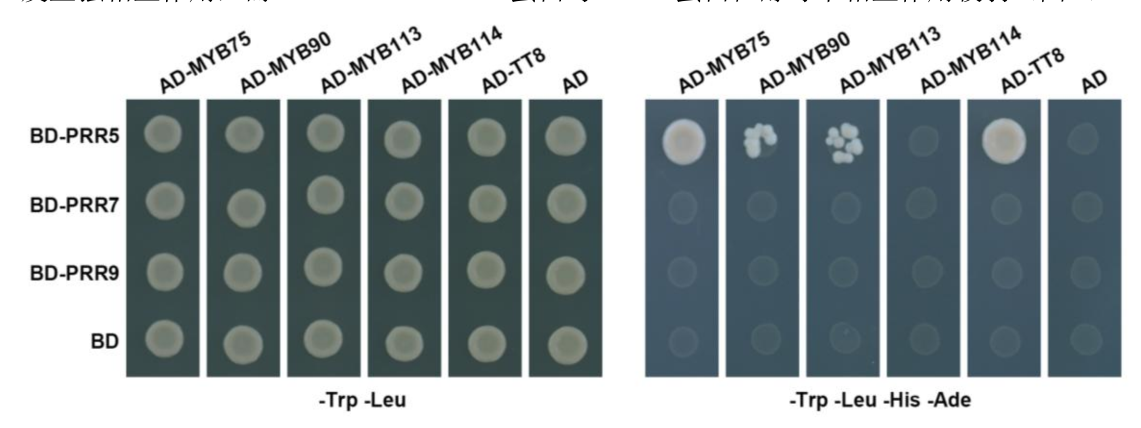


图 4 PRR5 与花青素合成相关的 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白在酵母中相互作用

Fig. 4 PRR5 physically interacts with the anthocyanin synthesis-related MYB75, MYB90,

MYB113 and TT8 proteins in yeast

为进一步验证 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白与 PRR5 蛋白相互作用，我们使用双分子荧光互补实验（BiFC）在植物体内进行检测分析。将 PRR5 与 *CaMV35S* 启动子驱动的 C 端黄色荧光蛋白（c-YFP）片段融合形成 PRR5-cYFP，并将 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 与 N 端 YFP 片段融合获得 MYB75-nYFP、MYB90-nYFP、MYB113-nYFP 和 TT8-nYFP。将 PRR5-cYFP 与 MYB75-nYFP、MYB90-nYFP、MYB113-nYFP 或 TT8-nYFP 共转化到烟草叶片中，我们在烟草细胞核内检测到强烈的荧光信号，而在相关的对照组中未观察到荧光信号（图 5）。这说明 PRR5 能与花青素合成相关的 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白在植物细胞核内相互作用形成复合物。

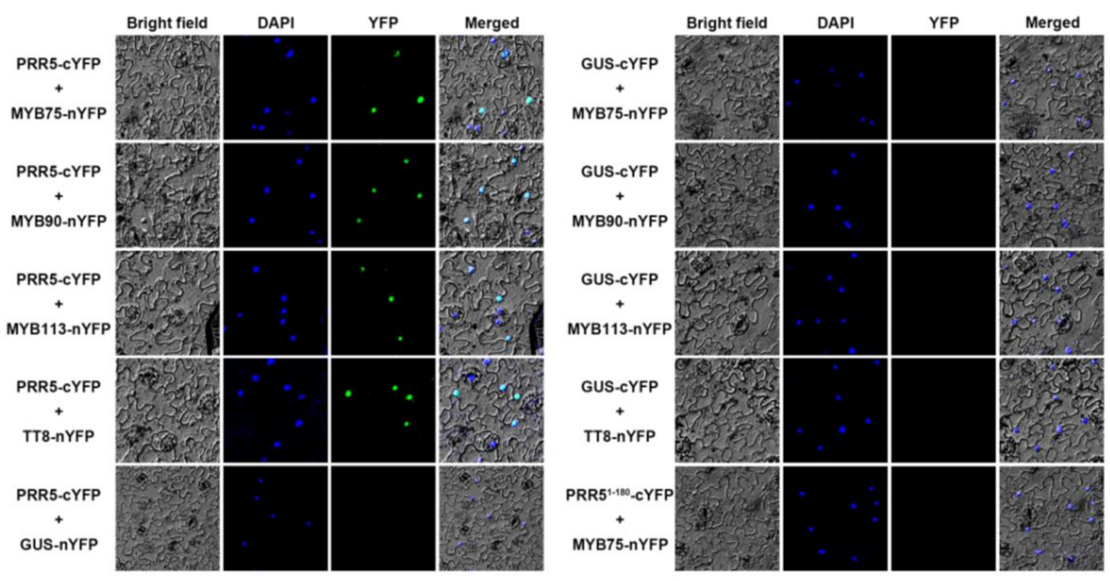


图 5 PRR5 与花青素合成相关的 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白在植物细胞中相互作用

Fig. 5 PRR5 physically interacts with the anthocyanin synthesis-related MYB75, MYB90, MYB113 and TT8 proteins in plant cells

2.5 MYB75 和 TT8 蛋白与 PRR5 蛋白相互作用的结构域

为了确定 PRR5 蛋白与 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白相互作用所必需的区域，将突变的 PRR5 序列融合到 Gal4 DNA 结合域载体作为诱饵，并进行了酵母双杂交分析。如图 6 A 所示，PRR5 蛋白的 PR 结构域（BD-PRR5$^{1-180}$）与 CCT 结构域（BD-PRR5$^{502-558}$）不与 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白相互作用，而 PRR5 蛋白 C 端片段（BD-PRR5$^{172-558}$）与 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白相互作用。这些结果表明，PRR5 的 C 端氨基酸结构域介导了 PRR5 蛋白与 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白之间的相互作用。同时，将在酵母中与 PRR5 蛋白强相互作用的 MYB75 和 TT8 蛋白突变为 N 端和 C 端，融合到 Gal4 DNA 激活域载体，并进行酵母双杂交分析。如图 6：B-C 所示，当 MYB75 和 TT8 蛋白的 N 端缺失时，它们不能与 PRR5 蛋白相互作用。这些结果表明，MYB75 和 TT8 蛋白的 N 端氨基酸结构域介导了它们与 PRR5 蛋白之间的相互作用。

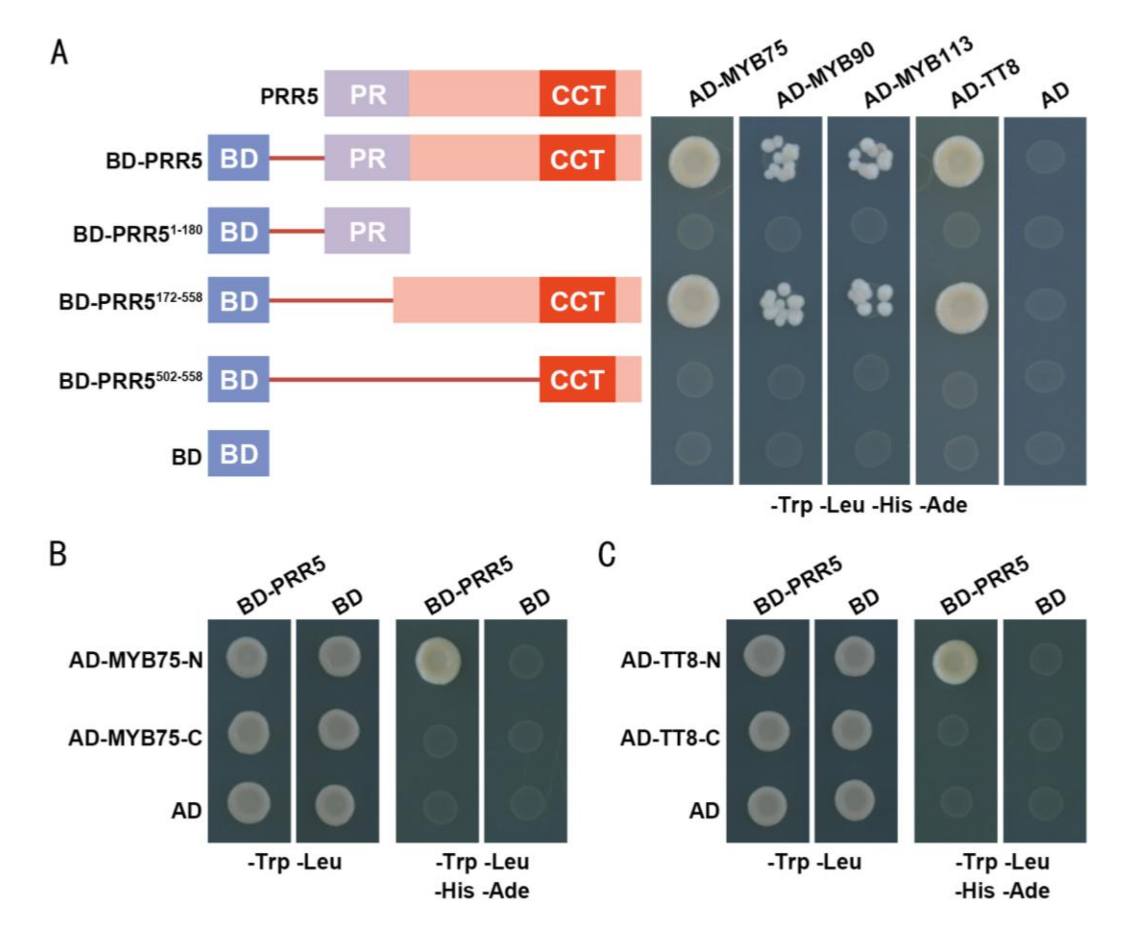


图 6 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白与 PRR5 蛋白相互作用的结构域

Fig. 6 Domains of MYB75, MYB90, MYB113 and TT8 proteins interacting with PRR5 protein

2.6 PRR5 促进花青素的合成依赖于 MYB 家族花青素调控蛋白

本研究前期研究发现，PRR 蛋白与花青素合成相关的 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 蛋白相互作用诱导花青素合成，进一步通过遗传学实验分析了 PRR5 促进花青素的合成是否依赖于 MYB 家族花青素调控蛋白的功能。通过拟南芥遗传杂交的方法，构建了 *myb-RNAi* 35*S:PRR*5-*FLAG* 的杂交材料，获得了 F_3 代纯合植物，并分析了花青素积累的表型。如图 7 所示，与 *myb-RNAi* 突变体表型一致，*myb-RNAi* 35*S:PRR*5-*FLAG* 杂交材料幼苗中花青素的积累显著下降，表现为茎尖的颜色较浅（图 7：A），通过花青素含量测定，结果与观察到的表型相一致（图 7：B）。这表明 PRR5 促进花青素的合成依赖于 MYB 家族花青素调控蛋白。

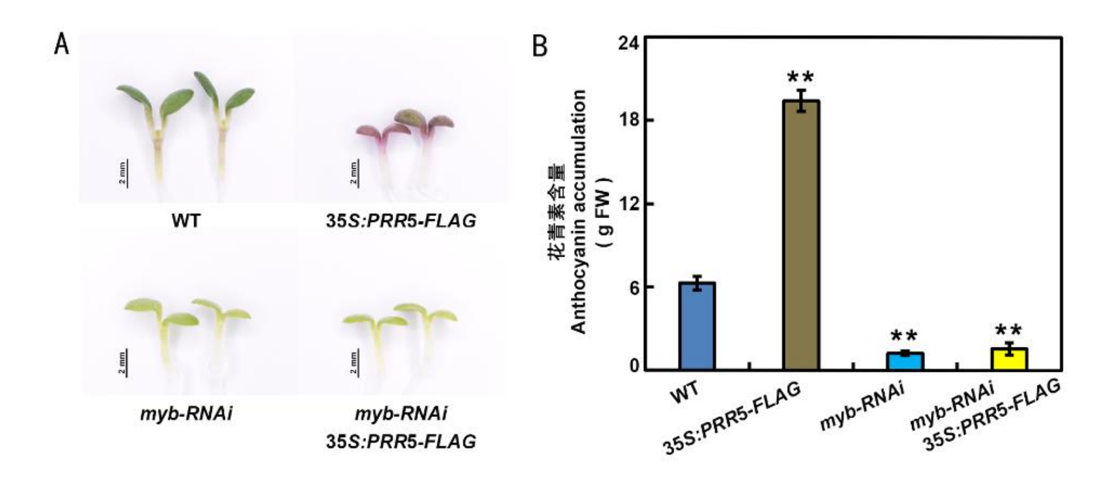


图 7 PRR5 促进花青素的合成依赖于 MYB75

Fig. 7 PRR5 promotes anthocyanin synthesis dependent on MYB75

3 讨论与结论

生物钟系统使植物可以感知和预测环境因子的周期性变化，以协调体内代谢稳态、生长发育与防御反应的动态平衡，使植物在合适的时间完成其关键生长发育过程（Greenham & McClung, 2015; Wei et al., 2018）。生物钟 PRR 蛋白家族在调控植物生长发育和响应逆境胁迫方面发挥了重要作用，影响幼苗光形态建成、增强拟南芥对寒冷、干旱和盐的耐受性等（Kreps et al., 2002; Kaczorowski & Quail, 2003; Keily et al., 2013; Liu et al., 2013）。近期有研究表明，生物钟 PRR 蛋白在种子萌发及萌发后生长过程中促进 ABA 信号，在白天抑制种子萌发及萌发后生长（Yang et al., 2021）。花青素在植物抵抗多种逆境胁迫中发挥重要作用，由 MYB、bHLH 和 WDR 三类转录因子形成的 MBW 复合体是其生物合成中最关键的转录调控因子（Liang et al., 2018; Li et al., 2018）。外源环境信号如光照、温度及内源植物激素信号脱落酸、茉莉酸等可以通过调控花青素合成相关基因的表达影响花青素生物合成与积累（Mori et al., 2007; Guo et al., 2008; Xie et al., 2016; Chen et al., 2020）。

本研究发现，生物钟 *PRR* 基因突变后拟南芥幼苗中花青素含量降低。进一步分析 *PRR* 基因双突变体和三突变体幼苗的表型发现，PRR5、PRR7 和 PRR9 协同促进幼苗花青素的积累。对 *PRR* 基因相关突变体进行 RT-qPCR 实验分析结果表明，花青素合成通路重要结构基因 *DFR*、*UF3GT* 和 *LDOX* 基因的相对表达量显著降低，且与花青素积累表型趋势一致。通过构建 *PRR5* 基因过表达转基因植物并检测其幼苗花青素含量，结果表明过表达 *PRR5* 转基因植物幼苗的花青素含量显著高于野生型。因此，本研究认为生物钟 PRR 蛋白能够通过调控某些花青素合成结构基因的表达来促进幼苗中花青素的合成。通过酵母双杂交与 BiFC 实验表明，PRR5 蛋白能与花青素合成调控蛋白 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 相互作用。拟南芥中的 PRR 蛋白家族属于 CCT(CONSTANS/CONSTANSLIKE/TOC1)大家族，它们都具有 N 端的 PRR/RLD(RECEIVER LIKE DOMAIN)结构域和 C 端的 CCT 结构域(Farre and Liu, 2013）。通过分段实验发现了 PRR5 蛋白 N 端的 PRR 结构域和 C 端的 CCT 结构域均不能与 MYB75 等调控蛋白相互作用，而包含 CCT 结构域的 C 端结构域介导了 PRR5 与 MYB75 等调控蛋白的相互作用。本研究还确认了与 PRR5 强相互作用的 MYB75、TT8 蛋白的 N 端介导了它们与 PRR5 蛋白的互作。因此，本研究认为生物钟 PRR5 蛋白能够与花青素合成调控蛋白 MYB75、MYB90、MYB113 和 TT8 等互作形成复合物。进一步构建 *myb-RNAi 35S:PRR5-FLAG* 杂交材料后发现，其幼苗的花青素含量与 *myb-RNAi* 突变体基本一致，表明 PRR5 促进花青素的合成依赖于 MYB 家族花青素调控蛋白。

综上所述，本研究认为拟南芥生物钟 PRR 蛋白能够促进幼苗中花青素的积累，并可能通过 PRR5 与 MBW 复合体相互作用调控花青素的合成。本研究发现了生物钟信号与花青素合成的联系，初步揭示了生物钟 PRR 蛋白促进拟南芥幼苗花青素合成的调控机制，对于深入理解生物钟信号调控植物环境适应性具有重要意义。种子萌发直至幼苗形态建成是植物生命周期中关键的发育阶段，也是植物适应环境最敏感的阶段之一，极易受到外界逆境环境的胁迫而死亡。拟南芥种子属于需光型种子，在土壤表层才能萌发生长，幼苗在白天更易受到强光、干旱等环境的胁迫。而花青素是植物天然的光保护剂，同时能够增强植物抗旱的能力（Guo et al., 2008; Ahmed et al., 2014）。本研究认为生物钟 PRR 蛋白促进幼苗花青素的合成与积累，以保护植物抵御白天可能的强光、干旱等逆境胁迫；同时 PRR 在白天抑制种子萌发和幼苗下胚轴伸长（Li et al., 2020; Yang et al., 2021），以协调防御反应和生长发育的动态平衡，使植物安全渡过关键生长发育过程。但 PRR 蛋白通过 MBW 复合体调控花青素合成的分子机制仍需进一步解析，生物钟 PRR 蛋白促进幼苗花青素合成的生物学功能在不同物种中是否具有保守性还需深入研究，这对于培育优良品种以及作物生产具有重要意义。生物钟系统其他蛋白是否参与调控花青素合成也有待进一步探索。

参考文献：

AHMED NU, PARK JI, JUNG HJ, et al., 2014. Characterization of *dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) genes and their association with cold and freezing stress in *Brassica rapa*[J]. Gene, 550(1): 46-55.

CHEN JJ, MEI S, HU YR, 2020. Abscisic acid induces anthocyanin synthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. Guihaia, 40(8): 1169-1180. [陈俊洁，梅松，胡彦如，2020. 脱落酸激素诱导拟南芥幼苗中花青素的合成[J]. 广西植物，40（8）：1169-1180.]

CHEN LH, HU B, QIN YH, 2019. Advance of the negative regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB transcription factors[J]. Plant Physiol Biochem, 136(7): 178-187.

DAVIES KM, ALBERT NW, SCHWINN KE, 2012. From landing lights to mimicry: the molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning[J]. Funct Plant Biol, 39(8): 619-638.

DENG YX, LU SF, 2017. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants[J]. Crit Rev Plant Sci, 36(4): 257-290.

FAN XP, FAN BH, WANG YX, et al., 2016. Anthocyanin accumulation enhanced in Lc-transgenic cotton under light and increased resistance to bollworm[J]. Plant Biotechnol Rep, 10: 1-11.

GARDELI C, VARELA K, KROKIDA E, et al., 2019. Investigation of anthocyanins stability from pomegranate juice (*Punica granatum* L. cv Ermioni) under a simulated digestion process[J]. Medicines, 6(3): 90.

GONZALEZ A, ZHAO M, LEAVITT JM, et al., 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings[J]. Plant J, 53(5): 814-827.

GREENHAM K, MCCLUNG CR, 2015. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants[J]. Nat Rev Genet, 16(10): 598-610.

GUO J, HAN W, WANG MH, 2008. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: A review[J]. Afr J Biotechnol, 7(25): 4966-4972.

HAN X, ZHANG MH, YANG ML, et al., 2020. *Arabidopsis* JAZ proteins interact with and suppress RHD6 transcription factor to regulate Jasmonate-stimulated root hair development[J]. Plant Cell, 32(4): 1049-1062.

HATIER JHB, CLEARWATER MJ, GOULD KS, 2013. The functional significance of black-pigmented leaves: photosynthesis, photoprotection and productivity in *Ophiopogon planiscapus* ‘Nigrescens’[J]. PLoS ONE, 8(6): e67850.

HE LH, TANG RM, SHI XW, et al., 2019. Uncovering anthocyanin biosynthesis related microRNAs and their target genes by small RNA and degradome sequencing in tuberous roots of sweetpotato[J]. Plant Biol, 19: 232.

HU YR, HAN X, YANG ML, et al., 2019. The transcription factor INDUCER OF CBF EXPRESSION1 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 and DELLA proteins to fine-tune abscisic acid signaling during seed germination in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 31(7): 1520-1538.

JI XH, WANG YT, ZHANG R, et al., 2015. Effect of auxin, cytokinin and nitrogen on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple[J]. Plant Cell Tiss Org, 120(1): 325-337.

KACZOROWSKI KA, QUAIL PH, 2003. *Arabidopsis* PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7 is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock[J]. Plant Cell, 15(11): 2654-2665.

KEILY J, MACGREGOR DR, SMITH RW, et al., 2013. Model selection reveals control of cold signalling by evening-phased components of the plant circadian clock[J]. Plant J, 76(2): 247-257.

KREPS JA, WU YJ, CHANG HS, et al., 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress[J]. Plant Physiol, 130(4): 2129-2141.

LI N, ZHANG YY, HE YQ, et al,. 2020 Pseudo response regulators regulate photoperiodic hypocotyl growth by repressing *PIF4/5* transcription[J]. Plant Physiol, 183 (2): 686–699.

LI SC, GUO JH, REVA A, et al., 2018. Methyltransferases of gentamicin biosynthesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 115(6): 1340-1345.

LI X, HE YM, XIE CM, et al., 2018. Effects of UV-B radiation on the infectivity of *Magnaporthe oryzae* and rice disease-resistant physiology in Yuanyang terraces [J]. Photochem Photobiol Sci, 17(1): 8-17.

LIANG LJ,YANG YC, WANG EH, et al., 2018. Research progress on biosynthesis and regulation of plant anthocyanin[J]. J Anhui Agric Sci, 46(21): 18-24. [梁立军，杨祎辰，王二欢，等，2018. 植物花青素生物合成与调控研究进展[J]. 安徽农业科学，46（21）:18-24.]

LIU T, CARLSSON J, TAKEUCHI T, et al., 2013. Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component PRR7[J]. Plant J, 76(1): 101-114.

MAIER A, HOECKER U, 2015. COP1/SPA ubiquitin ligase complexes repress anthocyanin accumulation under low light and high light conditions[J]. Plant Signal Behav, 10(1): e970440.

MAIER A, SCHRADER A, KOKKELINK L, et al., 2013. Light and the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA control the protein stability of the MYB transcription factors PAP1 and PAP2 involved in anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*[J]. Plant J, 74(4): 638-651.

MARIA J, LOPEZ G, INMACULADA GR, et al., 2019. Expression of miR159 is altered in tomato plants undergoing drought stress[J]. Plants, 8(7): 201.

MARTINEZ-GARCIA JF, HUQ E, QUAIL PH, 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor[J]. Science, 288(5467): 859-863.

MORI K, GOTO-YAMAMOTO N, KITAYAMA M, et al., 2007. Loss of anthocyanins in red-wine

grape under high temperature[J]. J Exp Bot, 58(8): 1935-1945.
NOMI Y, IWASAKI-KURASHIGE K, MATSUMOTO H, 2019. Therapeutic effects of anthocyanins for vision and eye health[J]. Molecules, 24(18): 3311.
PAYNE CT, ZHANG F, LLOYD AM, 2000. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1[J]. Genetics, 156(3): 1349-1362.
PEIFFER DS, WANG LS, ZIMMERMAN NP, et al., 2016. Dietary consumption of black raspberries or their anthocyanin constituents alters innate immune cell trafficking in esophageal cancer[J]. Cancer Immunol Res, 4(1): 72-82.
RINALDO AR, CAVALLINI E, JIA Y, et al., 2015. A grapevine anthocyanin acyltransferase, transcriptionally regulated by VvMYBA, can produce most acylated anthocyanins present in grape skins[J]. Plant Physiol, 169(3): 1897-1916.
SANCHEZ SE, KAY SA, 2016. The plant circadian clock: from a simple timekeeper to a complex developmental manager[J]. Csh Perspect Biol, 8(12): a027748.
SHI MZ, XIE DY, 2014. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*[J]. Recent Pat Biotechnol, 8(1): 47-60.
SHIN DH, CHO M, CHOI MG, et al., 2015. Identification of genes that may regulate the expression of the transcription factor production of anthocyanin pigment 1 (PAP1)/MYB75 involved in *Arabidopsis* anthocyanin biosynthesis[J]. Plant Cell Rep, 34(5): 805-815.
SONG JH, GUO CK, SHI M, 2021. Anthocyanin biosynthesis and transcriptional regulation in plant[J]. Mol Plant Breed, 19(11): 3612-3620. [宋建辉，郭长奎，石敏，2021. 植物花青素生物合成及调控[J]. 分子植物育种，19（11）：3612-3620.]
SUN Q, HUANG MY, WEI YQ, 2021. Diversity of the reaction mechanisms of SAM-dependent enzymes[J]. Acta Pharm Sin B, 11(3): 632-650.
TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A, 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. Plant J, 54(4): 733-749.
VARSHA T, CHENNA S, ASHWIN N, et al., 2019. MiR828 and miR858 regulate *VvMYB114* to promote anthocyanin and flavonol accumulation in grapes[J]. J Exp Bot, 70(18): 4775-4792.
WANG HX, WANG CY, FAN WJ, et al., 2018. A novel glycosyltransferase catalyses the transfer of glucose to glucosylated anthocyanins in purple sweet potato[J]. J Exp Bot, 69(22): 5444-5459.
WEI H, WANG Y, LIU B, et al. 2018. Deciphering the underlying mechanism of the plant circadian system and its regulation on plant growth and development[J]. Bull Bot, 53(4): 456-467. [魏华，王岩，刘宝辉，等，2018. 植物生物钟及其调控生长发育的研究进展[J]. 植物学报，53（4）：456-467.]
XIE Y, TAN HJ, MA ZX, et al., 2016. DELLA proteins promote anthocyanin biosynthesis via sequestering MYBL2 and JAZ suppressors of the MYB/bHLH/WD40 complex in *Arabidopsis thaliana*[J]. Mol Plant, 9(5): 711-721.
YANG ML, HAN X, YANG JJ, et al., 2021. The *Arabidopsis* circadian clock protein PRR5 interacts with and stimulates ABI5 to modulate abscisic acid signaling during seed germination[J]. Plant Cell, 33(9): 3022-3041.
ZHANG YQ, ZHENG S, LIU ZJ, et al., 2011. Both HY5 and HYH are necessary regulators for low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings[J]. J Plant Physiol, 168(4): 367-374.